Untersuchungen zur Feststellung eines erhöhten Antistreptolysingehaltes des Serums mit Hilfe einer Latex-Tropfen-Methode

Urania Schattenkirchner

1967

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546019_0078

Aus der Medizinischen Poliklinik
der Universität München
Direktor: Professor Dr. W. Seitz

Untersuchungen zur Feststellung eines erhöhten Antistreptolysingehaltes des Serums mit Hilfe einer Latex-Tropfen-Methode.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Urania Schattenkirchner, geb. Konté
Pharsala/Thessalien, Griechenland

München 1967

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München.

Referent: Professor Dr. W. Seitz
Dekan: Professor Dr. Fritz Holle
Tag der mündlichen Prüfung: 7. Nov. 1967

Meinem lieben Mann

und meiner kleinen Tochter Stephanie

gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Der Antistreptolysinnachweis.....7
A. Bedeutung des Antikörpernachweises gegen Streptolysin-O der beta-hämolysierenden Streptokokken in der rheumatologischen Diagnostik.....7
B. Prinzip der Antistreptolysin-Titer-Bestimmung mit Hilfe der hämolysierenden Eigenschaft des Streptolysin-O.....10
C. Normaltiter und obere Grenze der Norm.....12

II. Eigene Untersuchungen
A. Zweck der Untersuchungen, Problematik.....17
B. Durchführung der Untersuchungen.....18
1.) Methodiken.....18
a.) Titerbestimmung.....18
b.) Latex-Antistreptolysin-Reaktion.....21
C. Ergebnisse der Untersuchungen.....22

III. Diskussion der Ergebnisse unter dem Aspekt der klinischen Brauchbarkeit.....25

IV. Zusammenfassung.....26

V. Literaturnachweis.....27

I. Der Antistreptolysinnachweis

A. Bedeutung des Antikörpernachweises gegen Streptolysin-O der beta-hämolysierenden Streptokokken in der rheumatologischen Diagnostik.

Es ist heute als gesicherte Tatsache anzusehen, daß eine Infektion mit beta-hämolysierenden Streptokokken der Gruppen A, C oder G eine conditio sine qua non in der Ätiologie der akuten Polyarthritis darstellt. Ebenso bekannt ist die Rolle dieser Erreger in der Ätiologie des Scharlachs, der akuten Glomerulonephritis, des Erysipels und den meisten Formen von Angina tonsillaris. Die Sicherung der Streptokokkeninfektion ist bei diesen Erkrankungen ein wesentlicher diagnostischer Schritt und die bedeutendste Maßnahme hinsichtlich der Therapie. Der serologische Nachweis ist hierbei eine zuverlässige Methode. Unter den verschiedenen Toxinen der beta-hämolysierenden Streptokokken, die Antigencharakter haben, hat das Streptolysin-O die größte Bedeutung erreicht, sodaß der Antistreptolysinnachweis im Serum eine Methode geworden ist, die zum Gemeingut des Klinikers gehört.

Aus der rheumatologischen Praxis ist die Antistreptolysintiterbestimmung nicht mehr wegzudenken: In 60 bis 100 % [1] - nach verschiedenen Autoren - findet sich bei der akuten Polyarthritis ein erhöhter Antistreptolysintiter (AST). Im Falle einer klassischen akuten Polyarthritis ist der Befund eines erhöhten AST eine endgültige Bestätigung für die Richtigkeit der Diagnose. Bei differentialdiagnostischen Schwierigkeiten, z.B. zwischen einer akut beginnenden, noch rheumafaktornegativen, chronischen Polyarthritis und einer akuten Polyarthritis oder einer atypischen Form einer akuten Polyarthritis und einer chronischen Polyarthritis oder bei der Diagnose einer isoliert

vorkommenden Organmanifestation einer akuten Polyarthritis, wie einer Karditis, Neuritis oder Chorea, kann der Ausfall der Antistreptolysintiterbestimmung das entscheidende diagnostische Kriterium darstellen. Die Bedeutung des Nachweises einer möglichen Streptokokkenätiologie bei einer zu beurteilenden rheumatologischen Erkrankung und damit die Bedeutung der Antistreptolysinreaktion ist in den letzten Jahren infolge eines Wandels der Erkrankungen aus dem Formenkreis des rheumatischen Fiebers hinsichtlich der Krankheitsaktivität, des zeitlichen Verlaufes und der Organmanifestationen gewachsen. Das Vorhandensein von Fieber, von akuter Entzündung der großen Gelenke, von klinisch sich ausprägender Karditis ist seltener geworden, sodaß die Hauptkriterien zur Diagnose der akuten Polyarthritis der amerikanischen Heart Association [2] (Modifizierung der Kriterien nach Jones) meist nicht gefunden werden. Es wird daher vielfach eine Revision der diagnostischen Kriterien vorgeschlagen, in denen der Nachweis eines erhöhten AST von einem Nebenkriterium zu einem wesentlichen Kriterium für die Diagnose aufgewertet werden soll. (K ö l l e [3]).

Kriterien der American Heart Assosiation (modifiziert nach Jones)

Haupt-Kriterien	I. Karditis
	II. Polyarthritis
	III. Chorea
	IV. Subkutane Knötchen
	V. Erythema marginatum
Nebenkriterien	I. Fieber
	II. Arthralgien
	III. EKG-Veränderungen (P-Q- Verlängerung)
	IV. Aktivitätszeichen (BKS-Erhöhung, c.r.P.-Nachweis, Leukozytose)

V. Nachweis einer Infektion mit beta-hämolysierenden Streptokokken (bakteriologisch oder serologisch)

VI. Anamnese einer akuten Polyarthritis

Für T i c h y [4] waren der AST und der Rheumafaktor sogar Einteilungsgründe für alle Formen der Polyarthritis. In dieser Einteilung standen sich die Polyarthritis mit Rheumafaktor und normalem AST, also die serologisch klassische chronische Polyarthritis, und die Polyarthritis mit sehr hohem AST und negativem Rheumafaktor, also die akute Polyarthritis, als Pole gegenüber, zwischen die sich alle serologischen Kombinationsmöglichkeiten zwischen positivem und negativem Rheumafaktor und normalem oder mäßig erhöhtem oder stark erhöhtem AST einreihen. Mit dieser Einteilung löste sich T i c h y gedanklich von der rein verlaufsbeschreibenden los. Er findet dabei z.B., daß ein serologischer Typ mit mäßig erhöhtem AST und negativem Rheumafaktor ebenso wie einige Fälle vom Typ mit negativem Rheumafaktor und normalem AST der subakuten Polyarthritis entsprechen. Die Fortschritte in der Serologie und die wachsende Erfahrung in der Korrelation des klinischen Bildes mit dem entsprechenden serologischen Bild lassen auch Fragen der Nomenklatur und Klassifikation aufkommen. Konsequenterweise müßte man im diskutierten Falle die Frage stellen: "Wie sicher kann sein, daß bei Nachweis eines erhöhten AST eine Streptokokkenätiologie zugrundeliegt", und "Kann ich eine Arthritisform, die keine Streptokokkenätiologie hat, wenn eine symptomatische Arthritis ausgeschlossen ist, auch wenn sie keinen Rheumafaktor hat, etwa als idiopathische Polyarthritis [5] nach ätiologisch begründeter Nomenklatur bezeichnen ?"

Wenn man von einer verlaufsbeschreibenden Nomenklatur loskommen will, eine Notwendigkeit, die M a t h i e s [5] betont, muß man jedenfalls die streptokokkenbedingten Formen der Polyarthritis mit Sicherheit erfassen können und, da dies meist nur serologisch möglich ist, der AST-Bestimmung eine sehr hohe Bedeutung zumessen.

Schließlich ist noch der Vollständigkeit halber der diagnostisch wenig bedeutsame Befund von erhöhten AST-Titern bei Spondylarthritis ankylopoetica zu erwähnen. Man fand einen erhöhten AST-Titer in 40 % der Fälle. [6] Es wird diskutiert, ob Streptokokkeninfekte eine auslösende Rolle in der Ätiologie dieser Erkrankung spielen.

B. Prinzip der AST-Bestimmung mit Hilfe der hämolysierenden Eigenschaft des Streptolysin-O.

Die Antistreptolysinreaktion kann als eine weitgehend spezifische Antigen-Antikörperreaktion zum Zwecke des indirekten Nachweises einer überstandenen oder bestehenden Infektion mit beta-hämolysierenden Streptokokken der serologischen Gruppen A , C humanus und G definiert werden (K a l b a k 1947 [7]). Die genannten Bakterienstämme bilden das Streptolysin-O, ein sauerstoffempfindliches Fermentprotein, das durch seine blutkörperchenlösende Eigenschaft charakterisiert ist. Die Wirkung des Hämolysins ist folgendermaßen erklärt worden (B e r n h e i m e r [8]): In der ersten Phase tritt eine irreparable Schädigung der Erythrozyten ein (Latenzphase), in einer zweiten Phase schwellen die Erythrozyten infolge des Verlustes der selektiven Permeabilität an und platzen.

Die Bestimmung der Antikörpermenge besteht im Prinzip in der Feststellung, bei welcher Verdünnung eines zu untersuchenden Serums, der eine bestimmte Menge Streptolysin-O zugegeben wird, eine Hämolyse eintritt. Tritt diese erst bei einer starken Verdünnung auf, so ist eine große Antikörpermenge vorhanden.

Zur Herstellung angereicherter Präparationen von Streptolysin-O haben P e n t z und S h i g e m u r a [9] 1955 das ursprünglich von H e r b e r t und T o d d [10] angegebene Verfahren verbessert. Ein technisch einfacheres und erfolgreicheres Verfahren ist das von M e s r o b e a n und Mitarbeitern [11] 1958 ausgearbeitete. Das Antigen wird von Streptokokkenboullionkulturen durch chemische und physikalische Reinigungs- und Konzentrationsprozesse gewonnen.

Als Antistreptolysineinheit definierte T o d d [12] die Quantität Antistreptolysin, die eine Todd'sche Streptolysineinheit, nämlich 2 1/2 MDH (minimal haemolytic dose, geringste hämolysierende Dosis) neutralisiert. Es erwies sich jedoch bald, daß die Benutzung der Hämolysestärke des Streptolysins (ausgedrückt in MDH) als einzige genormte Größe im Reaktionsgeschehen nicht günstig ist. Aus Versuchen ergab sich eindeutig, daß die Bindungstärke des Streptolysins an Antistreptolysin unter den üblichen Aufbewahrungsbedingungen gleich bleibt, die Hämolysestärke sich dagegen im positiven oder negativen Sinne ändern kann. Da die Bindung Streptolysin-Antistreptolysin die spezifische Phase der Antistreptolysinreaktion darstellt, die Hämolyse nur den Indikator, lag es nahe, die Bindungsstärke des Streptolysins als feste Größe zu verwenden. Dem wurde I b s e n (Department of Biological Standards, Kopenhagen) [13] durch Schaffung eines Antistreptolysinstandardserums gerecht. Als Vergleichsmaterial

stand ein Kaninchenserum mit 20 000 Einheiten von Todd zur Verfügung. Das Kopenhagener Standardserum wurde als Lösung zu 10 ml mit einem Gehalt von 10 Einheiten / ml weitergegeben. Der dänische Standard wurde schließlich durch den internationalen der WHO ersetzt. Hierbei wurde das Standardserum aus dem Mischserum von drei Patienten mit hohem AST hergestellt. Verglichen mit dem dänischen Standard enthält das unverdünnte Serum 4305 Einheiten.
Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden die Einheitsangaben entsprechend diesem internationalen Standard gemacht.

C. Normaltiter und obere Grenze der Norm.

Bei Erkrankungen, die durch beta-hämolysierende Streptokokken der Gruppe A, C und G ausgelöst werden, wurden erhöhte Antikörpertiter vermutet und gefunden. Die ersten Arbeiten gehen auf T o d d [12] (1932) zurück. In den folgenden Jahren wurden diese Ergebnisse immer wieder bestätigt.
Nach Ablauf des akuten Stadiums einer streptokokkenbedingten Erkrankung sinkt der Antikörpertiter langsam wieder ab, bleibt dann aber auf einer gewissen Höhe stehen. Auch Gesunde weisen in ihrem Serum Antistreptolysin auf, da es praktisch nicht denkbar ist, daß sich ein Mensch nicht irgendeinmal mit betahämolysierenden Streptokokken immunologisch auseinandergesetzt hat. Dementsprechend ist die Höhe des Antistreptolysintiters (AST) des Gesunden, der sogenannte Normaltiter, außer von der Bereitschaft des Individuums, Antikörper zu bilden, abhängig ist von der Zahl und Folge der Streptokokkeninfekte, die er - sowohl klinisch manifest, als auch latent - durchgemacht

hat. W i l s o n und Mitarbeiter [14] fanden bei Neugeborenen einen AST, der im Bereich der mütterlichen AST lag. Vier Wochen nach der Geburt sank der Titer jedoch schnell ab und blieb auf einem sehr niederen Stand bis etwa zum 3. Lebensjahr. Dann stieg er konstant in die Höhe, bis er im 19. Lebensjahr seinen Höhepunkt erreichte. In höheren Altersstufen ist der AST dann wieder etwas niedriger [1].

Desweiteren läßt sich eine Abhängigkeit des Normaltiters von der geographischen Breite, d.h. wohl auch vom Klima, feststellen. In trockenen und heißen Klimazonen gibt es nach C o b u r n und P a u l i [15] weniger Streptokokkeninfekte. Die durchschnittlichen Normaltiter nehmen mit der geographischen Breite zu. In den südlichen Städten der Vereinigten Staaten vom 18. bis zum 34. Breitengrad fand sich ein durchschnittlicher Normaltiter von 71 Einheiten, in den nördlichen Städten vom 40. bis 46. Breitengrad ein solcher von 100 Einheiten. Dazu ist zu sagen, daß sich hierbei mehrere Faktoren ineinander verflechten. In den gemäßigten Zonen findet sich meist auch eine dichtere Bevölkerung mit einem anderen Zivilisationsstand, während die Möglichkeit der Weitergabe einer Streptokokkeninfektion in dünnbesiedelten, weniger hoch zivilisierten Ländern viel geringer ist. Für einen fördernden Einfluß auf die Weiterverbreitung von Streptokokkeninfektionen in einem Raume größerer Bevölkerungsdichte, spricht auch die häufige Zahl von Streptokokkeninfektionen und von Fällen mit rheumatischem Fieber in den englischen und amerikanischen Militärlagern während des letzten Weltkrieges [16].

In Deutschland haben verschiedene Autoren ebenfalls Untersuchungen angestellt, um durchschnittliche Normaltiter zu finden. C h r i s t [17] ermittelte für das Gebiet um Frankfurt einen Mittelwert von

155 Einheiten, einen Wert den S c h u l t z e und Mitarbeiter [18] auch für den Marburger Raum fanden. K ö h l e r [1] fand im südlichen Sachsen einen Mittelwert zwischen 68,2 und 103,4 (85,8 ± 5,88) Einheiten. Im Küstengebiet um Rostock jedoch fand er einen wesentlich höher liegenden Normaltiter zwischen 123 und 211 (167 ± 14,79) Einheiten. Der Autor weist dabei auf die erheblichen klimatischen Unterschiede dieser beiden Gebiete hin. Letztere Werte wurden auch im Frühling ermittelt. In den Sommermonaten ergab sich in demselben Gebiet ein niedrigerer Mittelwert von 137 ± 12,4 Einheiten. Bei einer Untersuchung von 600 Gesunden aus Nordostdeutschland fand K ö h l e r [1] einen Mittelwert des Normaltiters von 135,85 ± 4,52 Einheiten. In Unter- und Mittelfranken fand S c h m i d [19] bei der Untersuchung von 516 Seren von 6 bis 60-jährigen einen Mittelwert von 141 Einheiten, unter Einbeziehung auch der 1-5-jährigen von 131 Einheiten.

Für die Entscheidung, ob im Einzelfalle im Augenblick oder in kurz vorhergegangener Zeit eine Streptokokkeninfektion vorliegt bzw. abgelaufen ist, ergibt sich die Notwendigkeit, eine obere Grenze der Norm festzulegen.
Nimmt man 200 Einheiten als obere Grenze der Norm an, so findet K ö h l e r [1], trotz Fehlens irgendwelcher auf Streptokokkeninfekte deutender Erscheinungen, in seinem Untersuchungsmaterial 18,67 % mit Titern über diesem Wert, aber nur 8,17 %, wenn 250 Einheiten als Grenztiter angenommen wird. Außerdem gibt er zu bedenken, daß auch innerhalb relativ kleiner Gebiete verschiedene Klimazonen und schließlich auch die Altersstufen zu berücksichtigen sind.
K u p a t z und K ö h l e r [20] setzen deshalb für Nordostdeutschland folgende Grenzwerte fest:

Alter von 5 Monaten bis 5 Jahre 150 E,
von 5 Jahren bis 59 Jahre 250 E,
älter als 60 Jahre 200 E.

Im Münchener Raume liegt der durchschnittliche Normaltiter bei 186 Einheiten. Nimmt man 200 Einheiten als obere Grenze der Norm an, liegen noch 30 % der Werte darüber, bei 250 Einheiten jedoch nur 16 % und bei 333 Einheiten als obere Grenze der Norm 7 %. Diese Ergebnisse wurden aus Bestimmungen von 285 Blutspenderseren gewonnen (M a t h i e s [21]).

Wenn bei einer einmaligen Untersuchung ein Titer gefunden wird, der über der festgelegten oberen Grenze liegt, so braucht dies u.U. gar nichts zu bedeuten. In einem solchen Falle ist der Titerverlauf (d.h. Anstieg oder Abfall) bedeutsam, Der einmalige Befund eines erhöhten Titers muß also nur Veranlassung sein, im betreffenden Falle weitere Nachforschungen zu betreiben. Es muß in diesem Zusammenhang auch erwähnt werden, daß die AST-Bestimmung nicht ganz spezifisch ist. Bei lipoidreichen Seren und bei anderen Infektionen können trotz Fehlens von Erscheinungen, die auf einen Streptokokkeninfekt hindeuten, erhöhte Titer gefunden werden. Diese sog. falsch-positiven Ergebnisse versuchte man in letzter Zeit durch verschiedene Methoden (Albuminzusatz, Dextranmethode) zu verhindern [21].
Ein eindeutig normaler Wert bei einer einmaligen Untersuchung ist dagegen im Sinne eines Ausschlusses einer Streptokokkeninfektion im Zusammenhang mit einem zu diagnostizierenden klinischen Zustand wesentlich höher zu werten.
Es ist dabei allerdings zu berücksichtigen, daß ein schlechter Antikörperbildner auf eine Infektion mit beta-hämolysierendem Streptokokken u. U. mit einem

AST antworten kann, der sich noch im Normbereich bewegt oder nur wenig über die Norm hinaus erhöht liegt.

II. Eigene Untersuchungen

A. Zweck der Untersuchungen

Die Untersuchungen hatten zum Ziele, mit Hilfe einer genügenden Anzahl von Seren die Zuverlässigkeit und Brauchbarkeit einer neuen Methode zur Feststellung eines erhöhten Antistreptolysingehaltes im Serum zu prüfen. Die Latex-Tropfen-Methode, die von den Behringwerken Marburg ausgearbeitet und in den Handel gebracht wurde, kann natürlich keinen Aufschluß über die Höhe eines pathologischen Titers geben, da im Falle eines positiven Ergebnisses nur eine Agglutination auf dem Objektträger, ähnlich wie bei der Latex-Tropfen-Methode zum Nachweis des Rheumafaktors, sichtbar wird. Die Methode erfüllt ihren Zweck jedoch völlig, wenn durch sie mit einiger Sicherheit die Aussage, normaler bzw., erhöhter Titer, möglich ist, d.h., wenn sie als zuverlässige Suchreaktion angewendet werden kann. Im Falle eines positiven Ergebnisses wird man dann laufende Titerbestimmungen anschließen, um aus der Titerhöhe und dem Titerverlauf wichtige diagnostische Hinweise zu erhalten, im Falle eines negativen Ergebnisses könnte man die große Sicherheit haben, eine Streptokokkeninfektion bei dem zu untersuchenden klinischen Geschehen ausgeschlossen zu haben. Das besagt, daß es bei der Prüfung der Methode im wesentlichen darum geht, durch Vergleichsuntersuchungen mit der Hämolysemethode anhand einer ausreichenden Anzahl von Seren mit Titern vorwiegend um den oberen Normbereich festzustellen, wie zuverlässig sich die Aussage der Latexmethode bei einem bei uns gültigen oberen Normwert in negativ und positiv scheidet.

Als Vorteile weist die Methode einfache und schnelle Durchführbarkeit und eine im Vergleich zur Titerbestimmungsmethode höhere Spezifität auf. Es wird

nämlich bei der Latex-Tropfen-Methode die Antigen-Antikörperreaktion mit Hilfe der Agglutination der Latexpartikel, die mit Streptolysin-O beladen sind, direkt sichtbar gemacht, während bei der Titerbestimmungsmethode die Hämolyse fördernde oder hemmende Faktoren das Ergebnis verändern können. Eine Agglutination tritt bei diesem Test erst auf, wenn in dem zu untersuchenden Serum mehr als 200 Antistreptolysineinheiten pro ml enthalten sind. Das zu untersuchende Serum wird nämlich zunächst mit einer Streptolysin-O-Lösung von 200 Einheiten/ml abgesättigt. Erst bei einem AST über 200 Einheiten kann es dann zur Agglutination der mit Streptolysin-O beladenen Latexpartikel mit den noch freien Antikörpern des zu untersuchenden Serums kommen.

B. Durchführung der Untersuchungen

Es wurden insgesamt 209 Seren von Patienten mit Erkrankungen aus dem Formenkreis des rheumatischen Fiebers und von Gesunden untersucht. Die Titer wurden durch Doppelbestimmungen mit der herkömmlichen Methode entsprechend der Arbeitsanweisung der die Reagenzien herstellenden Behringwerke Marburg bestimmt (Verfahren nach K a l b a k [22], modifiziert von S c h e i f f a h r t und L e g l e r [23], mit geringen Veränderungen versehen von S c h u l t z e, S c h w i c k und V a s t e r s [18].
Mit der Latex-Tropfen-Methode wurden zum Teil nur Einzelbestimmungen gemacht, nachdem sich herausgestellt hatte, daß die Ergebnisse bei Doppelbestimmungen in jedem Falle übereinstimmen.

1.) Methodiken

a.) Die Titerbestimmung

Reagenzien:
Phosphatpuffer-Lösung pH 7,3

1,45 g $KH_2 PO_4$
7,60 g $Na_2 HPO_4 \cdot 2 H_2O$
4,80 g NaCl
gelöst ad 1 Liter aqua dest.

5 %ige Kaninchenblutkörperchen-Aufschwemmung
Das am besten mittels Herzpunktion gewonnene Kaninchenblut wird sofort nach der Entnahme durch Schütteln defibriniert und 3 mal mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen. Die gewaschenen Blutkörperchen werden 5 %ig in Phosphatpuffer-Lösung suspendiert. An Stelle von Kaninchenblutkörperchen können auch folgende Suspensionen verwendet werden:
2 %ige Hammelblutkörperchen-Suspension (frisch),
5 %ige Humanblutkörperchen-Suspension.
Für besonders genaue Messungen empfiehlt es sich, die Einstellung der Erythrozyten-Suspension durch photometrische Kontrolle nach Hämolyse vorzunehmen.

Natriumthioglykolat-Lösung Behringwerke
Eine Ampulle enthält 2,5 ml. Sie ist nach dem Öffnen bald zu verbrauchen.

Streptolysin-O-Reagens Behringwerke
Der Inhalt des Fläschchens mit 200 Einheiten Streptolysin-O wird in 5 ml physiologischer NaCl-Lösung aufgelöst. Von dieser Lösung stellt man eine Verdünnung 1: 12,5 folgendermaßen her:

1 ml Streptolysin-O
10,5 ml physiolog. NaCl-Lösung
1 ml Natriumthioglykolat-Lösung.

10 Minuten nach dem Mischen und Aufenthalt bei Raumtemperatur kann die reduzierte Streptolysinlösung zum Testen verwendet werden.
Die mit Thioglykolat aktivierte Streptolysinlösung ist sofort nach der Herstellung zu verbrauchen, während die nicht aktivierte Stammlösung bei Aufbewahrung im Kühlschrank einige Tage haltbar ist.

Standard-Human-Antistreptolysin-Serum Behringwerke. Eine Ampulle enthält 1 ml mit einer Antistreptolysin-Konzentration von 10 IE/ml. Eine Komplement-Inaktivierung durch Erwärmen ist nicht notwendig. Die Ausgangsverdünnungen von 1,0 und 1,5 IE/ml erhält man durch Vermischen von 0,2 ml Standardserum mit 1,8 ml bzw. 1,13 ml Phosphatpuffer-Lösung.

Arbeitsweise:
Zur Bestimmung des Antistreptolysin-O-Gehaltes einer Serumprobe wird eine Verdünnungsreihe des Standardserums mit aktiviertem Streptolysin-O inkubiert. Nach Zusatz einer Erythrozyten-Suspension wird die Hämolyse abgelesen.
Die Ausgangsverdünnungen des zu untersuchenden Serums (1 ml in Reagensröhrchen eingebracht) sind 1:50 und 1:75. Beide Ausgangsverdünnungen werden dann in einer Reihe jeweils auf die Hälfte des vorhergehenden Röhrchens weiterverdünnt, indem ausgehend von 1 ml stets 0,5 ml mit der Pipette in das nächste Röhrchen überführt wird und mit 0,5 ml Phosphat-Pufferlösung verdünnt wird. Das wird bei beiden Ausgangsverdünnungen je sechsmal durchgeführt, sodaß man schließlich in 14 Röhrchen Verdünnungen ausgehend von 1:50 über 1:75, 1:100, 1:150 bis zu 1:4800 hat.
In ähnlicher Weise wird das Standardserum ausgehend von einer Lösung von 1,5 IE/ml und 1,0 IE/ml verdünnt und zwar jeweils bis 1:4.
Zu jeder Verdünnung sowohl des Patientenserums als auch des Standardserums wird nun 0,5 ml Streptolysin-O-Lösung (1:12,5) hinzugegeben. Nachdem das Gemisch 25 Minuten im Wasserbad bei 37° gestanden hat, werden je 0,25 ml 5 %ige Kaninchenblutkörperchen-Suspension zugegeben. Das ganze bleibt nun 45 Minuten im Wasserbad bei 37° stehen.

Auswertung:
Standardserum und Patientenserum hemmen infolge ihres Antistreptolysin-O-Gehaltes die Hämolyse jeweils bis zu einem bestimmten Verdünnungsgrad. Es wird das erste Röhrchen bestimmt, bei dem gerade eine beginnende Hämolyse festzustellen ist. Bei vorschriftsmäßigem Arbeiten soll die Hämolyse im Standardserum bei einer Verdünnung 1:2 der Ausgangsverdünnung 1,5 IE/ml einsetzen. Abweichungen um eine bis zwei Titerstufen sind ohne Einfluß auf das Endergebnis. Bei größeren Abweichungen muß die Versuchsmethodik überprüft werden.
Der Antistreptolysingehalt des Patientenserums berechnet sich nach der Formel:

$$\frac{\text{Patientenserum-Gesamtverdünnung}}{\text{Standardserumverdünnung}} \quad \text{IE / ml}^{*}$$

*IE der Ausgangsverdünnung des Standardserums /ml, also 1,5 IE bzw. 1,0 IE.
Zum Beispiel: Patientenserumverdünnung, bei der Hämolyse eintritt, 1:800, Standardserumverdünnung (des Serums mit 1,5 IE/ml) 1:2.
AST des Patientenserums $\frac{800}{2}$. 1,5 IE/ml = 600 IE/ml

Für praktische Zwecke stehen zur Auswertung eine Tabelle zur Verfügung (Behringwerke Marburg).

b.) Die Latex-ASL-Reaktion

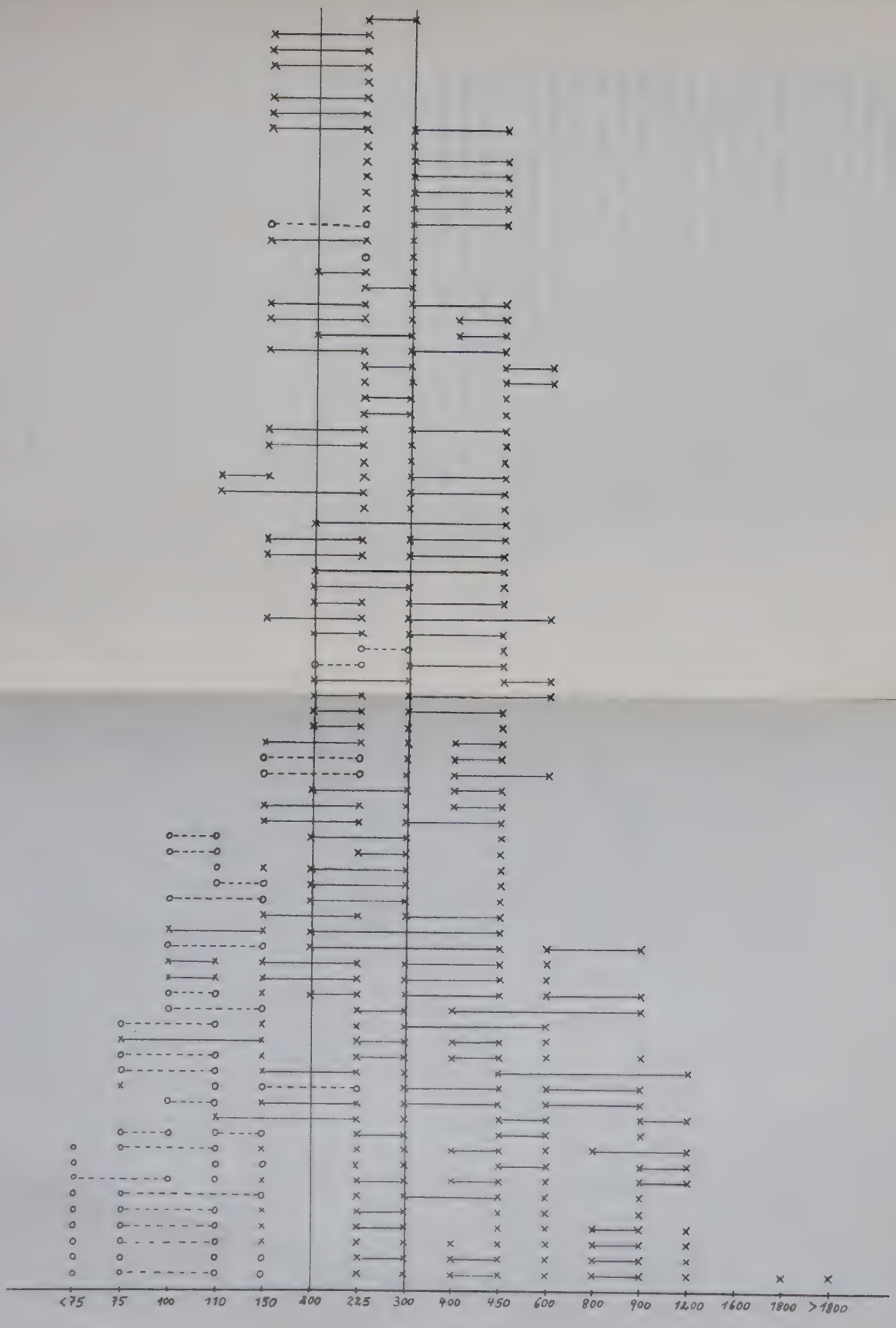
Reagenzien:
a.) Streptolysin-O-Reagens (Behringwerke) 200 IE
b.) Latex-ASL-Reagens (Behringwerke), Suspension von Latexpartikelchen, die mit Streptolysin beladen sind.
c.) Zu untersuchende Seren
d.) Physiologische Kochsalzlösung

Arbeitsweise:
Der Inhalt einer Flasche Streptolysin-O-Reagens (a)

wird in 5 ml physiologischer Kochsalzlösung (d) aufgelöst. Von dieser Lösung werden für jede Untersuchung 0,3 ml in ein Reagensglas gefüllt und 0,1 ml des zu untersuchenden Serums (c) zugegeben. Diese Mischung wird gut umgeschüttelt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wird ein Tropfen (0,05 ml) davon auf einen schwarzen Objektträger aufgetropft und mit einer Tropfpipette ein Tropfen Latex-ASL-Reagens (b) zugesetzt. Beides wird mit einem Stäbchen gut umgerührt und dann unter rotierendem Schwenken des Objektträgers nach 4-6 Minuten abgelesen. Eine sichtbare Reaktion der Latexpartikel gilt als positives Ergebnis.

C. Ergebnisse der Untersuchungen

Die Doppelbestimmungen der üblichen AST-Bestimmungen zeigen, daß Unterschiede von einer Titerstufe, gelegentlich auch mehreren Titerstufen in Kauf genommen werden müssen. Dieses Verhalten bestätigt die bekannte Schwankungsbreite der Methode. Beim Vergleich mit dem Latex-ASL-Test haben wir jeweils den höheren Wert unterschiedlicher Ergebnisse der Doppelbestimmung zugrundegelegt. Nach diesen Untersuchungen lagen uns Seren aus allen Titerbereichen zwischen < 75 IE und > 1800 IE vor. Der Vergleich zwischen Antistreptolysintiterbestimmung und dem Ergebnis der Latex-ASL-Reaktion ist in Tabelle 1 dargestellt. Links findet sich eine Gruppierung der Fälle nach den Ergebnissen der Antistreptolysin-Titerbestimmung. In dieser Gruppierung wurden die Titer < 200 IE und > 300 IE in je eine Gruppe zusammengefaßt. Die Grenzwerte von 200 IE, 250 IE und 300 IE wurden als gesonderte Gruppen herausgestellt.
Von den insgesamt 52 Fällen mit ASL-Titern von 200 IE und darüber zeigten 71,2 % einen negativen und 28,8 % einen positiven Ausfall der Latex-ASL-Reaktion. Zieht man eine Grenze bei 250 IE, so finden sich bei Titerergebnissen bis zu diesem Wert unter 107 Fällen 40,2 %


<75
75
100
110
150
200
225
300
400
450
600
800
900
1200
1600
1800
>1800

mit negativem und 59,8 % mit positivem Ausfall der Latex-ASL-Reaktion. 149 Fälle ergaben bei Titerbestimmung Werte bis 300 IE einschließlich. Von diesen zeigten 29,5 % einen negativen und 70,4 % einen positiven Ausfall der Latex-ASL-Reaktion. Diese Ergebnisse besagen, daß sich im Normbereich der ASL-Titerbestimmung, der bis 250 IE bis höchstens 300 IE für Erwachsene in Deutschland anzusetzen ist, eine relativ große Anzahl von Seren findet, bei der die Latex-ASL-Reaktion ein positives Resultat ergibt. Betrachtet man die Seren mit ASL-Titern von 250 IE und darüber, so findet man unter 201 Fällen nur 3,5 % negative, aber 96,5 % positive Ausfälle der Latex-ASL-Reaktion. Bei der Grenzziehung bei 300 IE in der ASL-Titerbestimmung findet man bei diesen Titern und darüber unter 146 Fällen nur 0,7 % negative und 99,3 % positive Ausfälle im Latex-ASL-Test. Schließlich findet sich bei ASL-Titern von über 300 IE in keinem der 104 Fälle noch ein negativer Ausfall der Latex-ASL-Reaktion. Man kann also festhalten, daß negative Ausfälle oberhalb der Normgrenze kaum zu erwarten sind.

III. Diskussion der Ergebnisse unter dem Aspekt der klinischen Brauchbarkeit.

Die Ergebnisse haben gezeigt, daß die Latex-ASL-Reaktion im Falle eines negativen Ergebnisses eine relativ sichere Aussage darüber erlaubt, daß keine Titer oberhalb der Normgrenze vorliegen. Dagegen ist die Aussagekraft, daß bei positiven Ergebnissen der Latex-ASL-Reaktion keine Titer im Normbereich vorliegen, gering. Bei positivem Ausfall der Latex-ASL-Reaktion ist also in jedem Falle die Durchführung einer Titerbestimmung zu fordern. In diesen Fällen ist mit 50,2 % Wahrscheinlichkeit (105 von 209 Fällen) damit zu rechnen, daß Titer von 300 IE und darunter gefunden werden. Bei negativem Ausfall der Latex-ASL-Reaktion kann man dagegen auf eine Titerbestimmung verzichten, da nur in 2,5 % der Fälle (1 Fall von 44 Fällen) mit einem Titer von 300 IE zu rechnen ist, während sonst Titer von maximal 250 IE vorliegen.
Es ist zu diskutieren, ob sich unter den "falsch positiven" Latex-ASL-Ergebnissen Seren finden, bei denen mit der üblichen Titerbestimmung ein erhöhter Antistreptolysingehalt des Serums nicht aufgedeckt wird. Auf der anderen Seite ist jedoch bekannt, daß unspezifisch erhöhte ASL-Titerbestimmungen (trotz angewandter Albumin- oder Dextran-Methode) möglich sind.

IV. Zusammenfassung

Es wurde die Brauchbarkeit eines Latex-Antistreptolysin-Tropfentestes zur groben Trennung von pathologischen und normalen Antistreptolysintitern untersucht. Bei negativem Ausfall des Testes kann mit großer Wahrscheinlichkeit damit gerechnet werden, daß kein erhöhter Antistreptolysintiter vorliegt. Dagegen kann bei positivem Ausfall des Testes nicht ausgesagt werden, daß ein erhöhter Antistreptolysintiter vorliegt. Bei positiven Ergebnissen des Latex-ASL-Tropfentestes ist in jedem Falle eine Titerbestimmung mit der üblichen Methode erforderlich.

V. Literaturnachweis

1. Köhler W. Die Serologie des Rheumatismus und der Streptokokkeninfektionen. Beiträge zur Hygiene und Epidemiologie Johannes Barth Leipzig 1963

2. American Heart Association
Jones criteria (modified) for guidance in the diagnosis of rheumatic fever
Circulation 13,/ 617 (1956)

3. Kölle G. Vortrag, Intern. Symposion: Das akute rheumatische Fieber. Reinhardsbrunn / Jena 1966

4. Tichy H. Serologische Grundtypen entzündlicher Rheumatismen als diagnostische Hilfe des praktischen Arztes.
Dt. Gesundheitswesen 18, /917 / (1963)

5. Mathies H. Intern. Symposion: Das akute rheumatische Fieber. Vortrag Reinhardsbrunn /Jena 1966

6. Ott R., Wurm H. Spondylitis ankylopoetica Steinkopff Darmstadt 1957

7. Kalbak K. The antistreptolysin-reaction. I Technique
The State Serum Institute Kopenhagen 1947.

8. Bernheimer A.W. Properties of certain rapidly acting bacterial toxins as illustrated by streptolysins O and S. Bact. Rev. 12,/196/, (1948) zit. nach 1.

9. Pentz E.J., Shigemura Y.
The production, concentrationand partial characterization of streptolysine O.
J. Bact. 69,/210/, (1955)

10. Herbert D. Todd E.W. Purification and properties of a haemolysin of group A haemolytic streptococci (Streptolysine O)
Biochem. J. 35,/1124/, (1941)

11. Mesrobean, Lydia, Baldovin, Coralia, Mihalco, Florica, Mitrica, Natalia
Purification et concentration de la streptolysin O par l'acide trichloracétique.
Arch. Roum. de athol. Expér.Microbiol. 17,/251/,(1958) zit nach 1.

12. Todd E.W.
Antihaemolysin titres in haemolytic streptococcal infections and their significance in rheumatic fever.
Brit. J. Exper. Path. 13,/248/ (1932)

13. Ibsen J.
A Standard for antistreptolysin O of human serum and its practical application.
Acta path. microbiol. scand. 21,/ 203/, (1944)

14. Wilson M.G., Wheeler G.W., Leask M.M.
Antistreptolysin content of blood serum of child. Its significance in rheumatic fever Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 31,/1001/,(1934)

15. Coburn A.F., Pauli R.H.
Limited observation on the antistreptosysin titer in relation to latitude.
J. Immunol. 29,/515/, (1935)

16. Rammelkamp CH. H., Denny F.W. Wannamaker L.W.
Studies on the Epidemiology of Rheumatic Fever in The Armed Services.
Minneapolis 1952.

17. Christ P.
Untersuchungen mit der Antistreptokinase-, Antihyaluronidase-, und der Antistreptolysin-Reaktion.
Zschr. Rheumaforsch. 12, /141/, (1953)

18. Schultze H. E., Schwick G., Vasters H.
Nachweis von Antistreptolysin O mit stabilem Trockenantigen.
Ärztl. Wschr. 99, / 324/, (1959)

19. Schmid W.
Ein Beitrag zum Antistreptolysinnormaltiter in Südwestdeutschland.
Z. Immunitätsforsch. 117,/ 124/, (1954)

20. Kapatz H., Köhler W. Die Antistreptolysinreaktion bei Erkrankungen des Kindesalters. Mschr. Kinderheilk. 103,/415, (1955)

21. Mathies H. unveröffentlicht (1967)

22. Schierz G., Sander C. Untersuchungen zur Spezifität der Antistreptolysinreaktion. Zschr. Imm. Allerg. Forschg. 129, /427/, (1965)

23. Kalbak K. Experimentelle og kliniske undersogelser over O-Streptolysin og forekomsten af O-antistreptolysin i serum. Kopenhagen 1942

24. Scheiffarth F., Legler F. Serologische und klinische Erfahrungen mit der Antistreptolysinreaktion bei akutem und chronischem Gelenkrheumatismus. Ärztl. Wschr. 6, /660/, (1951)

Für die Überlassung des Themas bin ich Herrn Professor Dr. W. Seitz zu großem Dank verpflichtet.
Herzlicher Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. H. Mathies für die Beratung und Betreuung bei der Durchführung der experimentellen Arbeit und der Abfassung der Dissertation.
Schließlich möchte ich mich ganz besonders bei Frl. H. Gaedicke für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Arbeit bedanken.

Lebenslauf.

Am 20. Oktober 1938 wurde ich als zweites der fünf Kinder meiner Eltern Demetrius und Nausikaa Kontè, geb. Risiotou, in der kleinen thessalischen Stadt Pharsala in Griechenland geboren. Dort besuchte ich auch die Volksschule und das Gymnasium und legte im Sommer 1957 die Reifeprüfung ab. Nachdem ich ein halbes Jahr in Athen die deutsche Sprache studiert hatte, kam ich im Frühjahr 1958 nach München, um mich für das Studium der Medizin einzuschreiben.Ein Jahr später legte ich das Vorphysikum ab. Nach zwei weiteren Semestern ging ich an die Universität Erlangen, wo ich im Frühjahr 1961 das Physikum bestand und anschließend ein klinisches Semester verbrachte. Nach weiteren fünf Semestern in München beendete ich mein Studium mit dem medizinischen Staatsexamen im Oktober 1964.
Im Dezember 1964 verheiratete ich mich mit meinem Kollegen Dr. Manfred Schattenkirchner. Wir haben eine nun zweijährige Tochter.
In diesem Jahre beendige ich meine Medizinalassistentenzeit.